

文章编号 1006-8147(2017)04-0300-04

论 著

# 柴胡皂苷 a 影响大鼠急性脊髓损伤后机体炎症水平表达的实验研究

朱双龙<sup>1,2,3</sup>, 陈旭义<sup>3</sup>, 段会全<sup>1,2</sup>, 刘迎节<sup>1,2</sup>, 孙中磊<sup>4</sup>, 徐云强<sup>1,2</sup>

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津医科大学总医院骨科, 天津 300052; 3.武警后勤学院附属医院脑科中心, 天津 300162; 4.锦州医科大学研究生院, 锦州 121000)

**摘要** 目的:探讨不同浓度柴胡皂苷 a 对大鼠急性脊髓损伤早期组织和血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素-6(IL-6)表达水平的影响。方法:选用健康成年 SD 大鼠 30 只,随机分为假手术组、单纯损伤组、柴胡皂苷 a 5 mg/kg 组、10 mg/kg 组、20 mg/kg 组共 5 组。利用改良 Allen's 重物打击法制作急性脊髓损伤模型。单纯损伤组注入生理盐水,药物组通过腹腔注射。所有动物分组于术后 24 h 处死,以损伤段为中心上下取脊髓 10 mm 和大鼠腔静脉血清 2 mL,采用 ELISA 法检测各组大鼠脊髓组织和血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平。结果:(1)单纯损伤组大鼠脊髓组织和血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均高于假手术组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。(2)柴胡皂苷 a 5 mg/kg 组、10 mg/kg 组、20 mg/kg 组大鼠脊髓组织和血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均低于单纯损伤组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。(3)柴胡皂苷 a 10 mg/kg 组、20 mg/kg 组大鼠脊髓组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平低于 5 mg/kg 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),10 mg/kg 组与 20 mg/kg 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。大鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平柴胡皂苷 a 20 mg/kg 组低于 5 mg/kg 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),10 mg/kg 组与 20 mg/kg 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:柴胡皂苷 a 通过影响急性脊髓损伤早期炎症因子的表达减轻继发性免疫炎症反应,从而改善机体免疫功能;10mg/kg 组效果优于其他实验组,且该药物可能部分通过脊血屏障。

**关键词** 急性脊髓损伤;柴胡皂苷 a;肿瘤坏死因子  $\alpha$ ;白介素 6;大鼠

中图分类号 R744

文献标志码 A

## Effect of saikosaponin a on expression of inflammation in rats after acute spinal cord injury

ZHU Shuang-long<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xu-yi<sup>3</sup>, DUAN Hui-quan<sup>1,2</sup>, LIU Ying-jie<sup>1,2</sup>, SUN Zhong-lei<sup>4</sup>, XU Yun-qiang<sup>1,2</sup>

(1.Department of Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Orthopedic, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 3.Department of Brain, Affiliated Hospital of Logistics College of CAPF, Tianjin 300162, China; 4. Department of Graduate School, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of saikosaponin a on the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the early stage of acute spinal cord injury in rats. **Methods:** Thirty SD rats were randomly divided into sham operation group, simple injury group, saikosaponin a 5 mg/kg group, 10 mg/kg group, 20 mg/kg group, respectively. The acute spinal cord injury model was made by modified Allen's heavy blow method. The rats in the injury group were injected with normal saline only, and the drug groups were intraperitoneally injected with the different dosages. All the animals were sacrificed at 24 h after the operation. The spinal cord of the injured segment and the vena cava sera were taken for 10 mm and 2 mL, respectively. The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the spinal cord tissue and serum were detected by ELISA. **Results:** TNF- $\alpha$  and IL-6 in the spinal cord tissue and serum of the rats in the pure injury group were higher than those in the sham group ( $P < 0.05$ ). The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in spinal cord tissue and serum of rats treated with saikosaponin a 5 mg/kg, 10 mg/kg and 20 mg/kg were lower than those of the pure injury group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expressions of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the spinal cord tissue of rats treated with 10 mg/kg group and 20 mg/kg group were lower than those of 5 mg/kg group ( $P < 0.05$ ), there was no significant difference between 10 mg/kg group and 20 mg/kg group ( $P > 0.05$ ). The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum of rats treated with 20 mg/kg were lower than those of 5 mg/kg group ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between 10 mg/kg group and 20 mg/kg group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Saikosaponin a could reduce the secondary immune inflammatory response by affecting the early expression of inflammatory factors to improve the body's immune function in acute spinal cord injury. The 10 mg/kg group is superior to the other groups, and the drug may partially pass through the spinal blood barrier.

**Key words** acute spinal cord injury; saikosaponin a; tumor necrosis factor  $\alpha$ ; interleukin-6; rat

脊髓损伤(SCI)是严重的神经系统疾病之一,

基金项目 国家自然科学基金青年基金资助项目(81101362,11102235)

作者简介 朱双龙(1989-),男,硕士在读,研究方向:脊柱脊髓损伤神经修复;通信作者:徐云强,E-mail:docxu@sina.com;陈旭义,E-mail:chenxuyi1979@126.com。

具有高发病率和致残率。据有关文献报道,美国大约有 250 万人受到脊髓损伤的影响,每年新增患者超过 130 000 例<sup>[1]</sup>。我国脊柱损伤发病率 25~35 例/10 万人,大约 1/7~1/6 伴有脊髓损伤<sup>[2]</sup>。急性脊髓损

伤的病理生理改变涉及原发性损伤和继发性损伤机制<sup>[3]</sup>,免疫炎症反应是继发性损伤的重要机制,其过度产生会引起组织损伤及神经元的死亡加剧,影响脊髓损伤后神经元的修复和功能的改善。因此减轻继发性损伤通常被认为是对脊髓损伤的有效治疗方法<sup>[1,4-5]</sup>。目前,对脊髓损伤的治疗已经有许多药物和治疗措施进入临床实验阶段,但调节炎症免疫应答方面的效果仍有待提高。在我国传统中医学中,中药治疗中枢系统损伤具有良好的效果。柴胡皂苷属于中药柴胡家族,是从柴胡分离的主要化学成分。柴胡皂苷已被证明在抗炎,抗惊厥,抗癫痫和免疫调节中发挥作用。Xiang等<sup>[6]</sup>研究表明,柴胡皂苷a可减轻颅脑创伤后AQP-4蛋白、MMP-9蛋白和炎症因子的表达,从而减轻脑组织水肿,保护受损神经组织。此外,柴胡皂苷被证明在内皮细胞中可以调节金属蛋白酶(MMPs)的表达。柴胡皂苷a是柴胡皂苷的主要活性成分之一<sup>[7]</sup>。虽然,柴胡皂苷a已经在其他疾病被证明有抗炎调节免疫作用,但柴胡皂苷a在脊髓损伤方面的抗炎免疫作用尚罕见相关报道。本实验利用大鼠急性脊髓损伤模型进行研究,并用不同药物浓度柴胡皂苷a对其进行干预治疗,选择损伤段脊髓组织和血清,观察该药物对急性脊髓损伤大鼠免疫功能的影响,以期找到减轻脊髓继发性损伤的药物应用于临床。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及材料

1.1.1 实验动物与分组 选用健康SD雌性大鼠30只,大鼠体质量为220~250 g,由中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所提供(生产许可证号:SCXK(军)2014-0001)。将大鼠饲养在24 h昼夜节律下,实验室温度维持在25℃左右,湿度适宜。将实验动物随机分为5组:假手术组、单纯损伤组、柴胡皂苷a 5 mg/kg组、柴胡皂苷a 10 mg/kg组、柴胡皂苷a 20 mg/kg组。

1.1.2 主要仪器和设备 自制脊髓损伤打击器,去离子水机(Thermo公司,美国),4℃低温离心机(Eppendorf公司,德国),CO<sub>2</sub>细胞培养箱(Forma scientifics公司,美国),高压灭菌箱(SHINVA公司,中国),实验用器械(上海医疗器械有限公司手术器械厂),快速组织细胞破碎仪(欧诺,中国)。

1.1.3 实验试剂与药物 柴胡皂苷a(上海源叶生物科技有限公司),TNF-α ELISA和IL-6 ELISA抗体和相关试剂盒(武汉六合生物技术有限公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 大鼠急性脊髓损伤模型制作 脊髓造模参

考文献[1,8],利用改良Allen's重物打击法制作急性脊髓损伤模型。5%水合氯醛按0.6 mL/100 g的比例腹腔麻醉完毕后,沿肩胛骨平对T1向下逐个计数,直至定位T10,备皮暴露手术区,然后固定于已消毒的手术木板上,取俯卧位,以T10位置为中心,沿脊柱正中做长约2 cm的纵形切口,逐层分离皮下组织和椎旁肌以暴露T9-T11节段棘突及其椎板,使用微型咬骨钳咬除1/2T9-1/2T11棘突及其两侧椎板,暴露硬膜,压迫止血。将大鼠置于自制脊髓损伤打击器上,精确定位打击位置位于T10脊髓节段,打击重锤重量10 g,直径2.5 mm,将打击头接触T10脊髓节段,调节打击重锤高度为5 cm后打击,致重度SCI,立即可见脊髓局部水肿形成。实验处理完毕,在术后24 h麻醉下先取一定量的大鼠腔静脉血液放入促凝管中静止20 min,3 000 r/min离心5 min,取血清,并在损伤部位上下取出脊髓组织10 mm左右,然后颈椎拉断处死大鼠,将血清和组织放置于-80℃冰箱保存。

1.2.2 造模成功标准 打击后见大鼠双后肢抽动、甩尾,随后完全松弛。造模后所有动物存活,无伤口感染情况,大鼠双后肢瘫痪。

1.2.3 药物干预方法 造模前将各组大鼠称重并认真记录,药物实验组大鼠在造模完成后立即根据体质量腹腔注入相应剂量的药物(5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg)。单纯损伤组只注入生理盐水。

1.2.4 ELISA法检测各组大鼠脊髓组织相关炎症因子的表达水平 脊髓组织加入PBS溶液后在组织细胞破碎仪中6 000 r/min进行匀浆6 min,在低温条件下(4℃)3 000 r/min离心20 min,取上清液,将上清液分装,组织液和血清按照从上到下、从左到右,浓度从高到低的顺序依次加入孔板中,大致经过孵育,洗板,加抗体孵育,洗板,加抗体孵育,终止反应等顺序,最后在酶标仪中检测OD值,换算炎症因子表达浓度。

### 1.3 主要观察指标

1.3.1 组织TNF-α和IL-6表达水平检测 将组织上清加入到96孔板中,在酶标仪上测出其OD值,计算出其表达浓度,观察柴胡皂苷a对急性脊髓损伤组织相关炎症因子的表达影响情况。

1.3.2 血清TNF-α和IL-6表达水平检测 将低温保存的血清室温解冻,必要时可以离心,加入96孔板中,在酶标仪上测出血清OD值,计算出其表达浓度,观察柴胡皂苷a对急性脊髓损伤血液中相关炎症因子的变化。

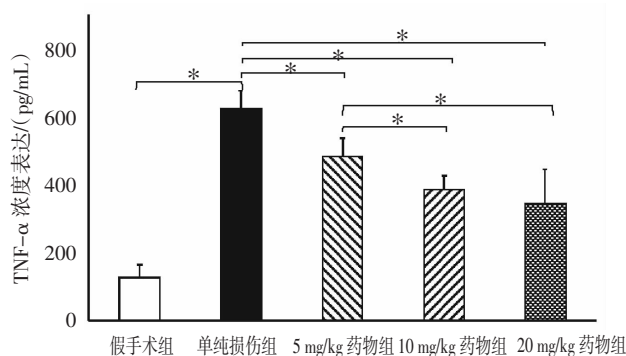
1.4 统计学分析 采用SPSS 22.0进行数据处理,

TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用 30 只雌性大鼠, 分为 5 组, 实验中无动物死亡, 全部进入结果分析。

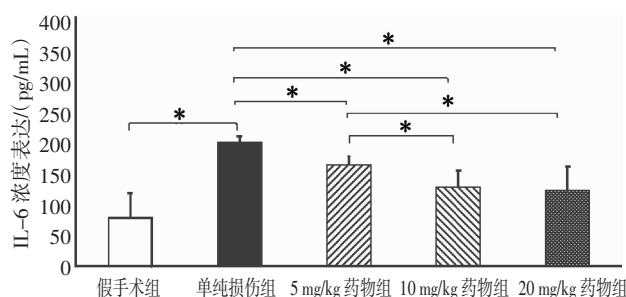
2.2 脊髓组织中炎症因子表达 单纯损伤组大鼠脊髓组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平高于假手术组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。柴胡皂苷 a 5 mg/kg 组、10 mg/kg 组、20 mg/kg 组大鼠脊髓组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均低于单纯损伤组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。柴胡皂苷 a 5 mg/kg 组大鼠脊髓组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平高于 10 mg/kg 组、20 mg/kg 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。柴胡皂苷 a 10 mg/kg 组和 20 mg/kg 组脊髓组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平二者无明显差异 ( $P > 0.05$ )。见图 1, 图 2。



与假手术组对比, 单纯损伤组  $*P < 0.05$ ; 与单纯损伤组对比, 不同药物浓度组  $*P < 0.05$ ; 与 5 mg/kg 组对比, 10 mg/kg 组和 20 mg/kg 组  $*P < 0.05$

图 1 大鼠脊髓组织中炎症因子 TNF- $\alpha$  的表达

Fig 1 The levels of inflammatory factor TNF- $\alpha$  in the rat spinal cord tissue



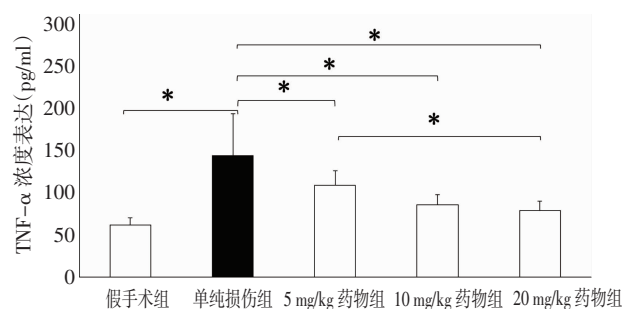
与假手术组对比, 单纯损伤组  $*P < 0.05$ ; 与单纯损伤组对比, 不同药物浓度组  $*P < 0.05$ ; 与 5 mg/kg 组对比, 10 mg/kg 组和 20 mg/kg 组  $*P < 0.05$

图 2 大鼠脊髓组织中炎症因子 IL-6 的表达

Fig 2 The levels of inflammatory factor IL-6 in the rat spinal cord tissue

2.3 大鼠血液炎症因子表达 单纯损伤组大鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平高于假手术组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。柴胡皂苷 a 5 mg/kg 组和 10 mg/kg 组、20 mg/kg 组大鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平

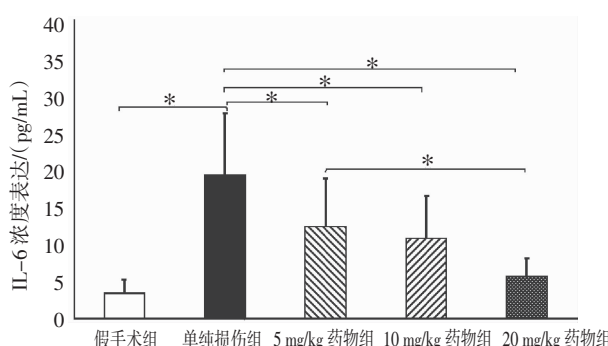
均低于单纯损伤组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。柴胡皂苷 a 5 mg/kg 组血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平高于柴胡皂苷 a 20 mg/kg 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 10 mg/kg 组与 20 mg/kg 组对比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3、4。



与假手术组对比, 单纯损伤组  $*P < 0.05$ ; 与单纯损伤组对比, 不同药物浓度组  $*P < 0.05$ ; 与 5 mg/kg 组对比, 20 mg/kg 组  $*P < 0.05$

图 3 大鼠血清中炎症因子 TNF- $\alpha$  的表达

Fig 3 The levels of inflammatory factor TNF- $\alpha$  in the rat serum



与假手术组对比, 单纯损伤组  $*P < 0.05$ ; 与单纯损伤组对比, 不同药物浓度组  $*P < 0.05$ ; 与 5 mg/kg 组对比, 20 mg/kg 组  $*P < 0.05$

图 4 大鼠血清中炎症因子 IL-6 的表达

Fig 4 The levels of inflammatory factor IL-6 in the rat serum

## 3 讨论

在炎症介质网络中, 炎症因子 TNF- $\alpha$  和白细胞介素-6 对炎症的发生和发展起到关键性作用<sup>[9]</sup>。据有关文献报道, 在脊髓损伤早期炎症因子 TNF- $\alpha$  就开始表达, 其不但促进白细胞在损伤缺血区的聚集和浸润, 并且能增强中性粒细胞与内皮细胞的粘附和激活, 介导其他细胞因子的产生<sup>[10]</sup>。IL-6 是由多种细胞包括单核细胞/巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞对内毒素、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  刺激下反应产生的。IL-6 的水平升高已经在许多急性病症中报道, 如烧伤, 大手术和败血症等<sup>[11]</sup>。

柴胡皂苷 a 主要来源于伞形科植物柴胡 (Bupleurum Chinese, DC), 具有较强的抗炎作用, 其对包括炎症介质释放、渗出、毛细血管通透性增强、白细胞游走和结缔组织增生在内的多方面病理生理变化都有影响, 同时还具有明显的调节抗炎免



疫、抗肝纤维化、镇静和抗惊厥作用<sup>[12-13]</sup>。此外,柴胡皂苷a在中枢神经系统也起到良好的保护作用,张列亮等<sup>[13]</sup>研究发现,柴胡皂苷a通过影响海马组织内的cAMP/CREB信号通路及BDNF的表达改善脑创伤后大鼠认知功能,对脑神经组织起到保护作用。

脊髓损伤(SCI)的原发性损伤主要是造成脊髓神经组织结构的稳态阈值被打破,从而引起各种血管、生化和细胞过程继发性损伤机制<sup>[14]</sup>。通常SCI后立即形成炎症反应、氧化和组织水肿<sup>[15]</sup>。嗜中性粒细胞浸润可以通过产生活性氧直接损伤组织和分泌炎症介质<sup>[16]</sup>。在中枢神经系统中,过多炎症介质的产生可能导致组织水肿,细胞代谢应激和组织坏死<sup>[17]</sup>。因此,主动调节炎症细胞因子可具有治疗作用<sup>[4]</sup>。

本实验主要通过探讨炎症反应在急性脊髓损伤发生发展过程中的作用,并进一步证实柴胡皂苷a在急性脊髓损伤过程中对继发性损伤炎症反应的干预和减轻作用,从而保护损伤脊髓组织,在一定程度上加强脊髓损伤后的免疫作用<sup>[13]</sup>。急性脊髓损伤后,发生缺血再灌注损伤、炎症反应等继发性损伤,机体通过TNF- $\alpha$ 和IL-6等炎症细胞因子诱发的级联反应促进细胞凋亡的发生、炎症反应的加重以及脊髓组织水肿的加重,进而导致脊髓损伤的加重<sup>[18]</sup>。本实验研究结果证实,脊髓损伤组大鼠脊髓组织和血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6水平高于假手术组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),进一步印证了该理论。在本实验的不同药物浓度组中,5 mg/kg组大鼠脊髓组织中TNF- $\alpha$ 和IL-6表达水平高于10 mg/kg组、20 mg/kg组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),得出10 mg/kg组与20 mg/kg组治疗效果优于5 mg/kg组,而10 mg/kg组与20 mg/kg组二者组织中TNF- $\alpha$ 和IL-6表达水平无明显统计学差异( $P>0.05$ )。本着用药少,副作用小的原则,我们认为10 mg/kg组在本实验中优于其他实验组。从不同药物浓度组对大鼠血清炎症水平表达结果来看,与单纯损伤组比较有统计学差异( $P<0.05$ ),5 mg/kg组与20 mg/kg组比较有统计学差异( $P<0.05$ ),但10 mg/kg组与20 mg/kg组之间无统计学差异,推测可能由于脊髓损伤后脊血屏障受损,影响该药物的通透性,部分药物通过脊血屏障从而影响机体免疫炎症因子表达,需进一步实验论证。本实验结果还提示,急性脊髓损伤后柴胡皂苷a治疗可以减轻脊髓神经组织的炎症反应,减少脊髓组织和血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6生成,从而可能促进受损神经的恢复或延缓继发性损害,具有神经保护作用。

总之,柴胡皂苷a能够减轻急性脊髓损伤后早期炎症水平的表达,从而改善脊髓损伤的微环境,延

缓继发性损伤,为用于临床急性脊髓损伤的治疗提供重要的实验依据,但其具体机制有待更深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Chen W, Chang L, Kai G, et al. Metformin preconditioning provide neuroprotection through enhancement of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis after spinal cord injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(4): 534
- [2] 黄学英,王丽华,柳尧花.MOTomed运动训练在颈髓损伤四肢瘫痪患者康复中的应用[J]. *海军医学杂志*, 2015, 36(6): 581
- [3] Philip F S, Todd V H, Michael A F. Management strategies for acute spinal cord injury: current options and future perspectives[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2012, 18(6): 651
- [4] Anwar M A, Al Shehaby T S, Eid A H. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury[J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 1
- [5] 王涛丽,顾兵,李华南,等.急性脊髓损伤后的炎症反应及其抗炎治疗[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(4): 452
- [6] Xiang M, Zonggang H, Guozhuan M, et al. Saikosaponin a protects TBI rats after controlled cortical impact and the underlying mechanism[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(1): 133
- [7] 茆翔,朱振丹,郝淑煜,等.柴胡皂苷a对创伤性脑水肿的保护作用[J]. *中国医刊*, 2014, 49(7): 65
- [8] 田小磊,王坤,靳安民.内质网应激相关蛋白在大鼠急性脊髓损伤中的表达及其意义[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(20): 5796
- [9] Wang L M, Tan J, Wang S H, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexpanthenol on lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice[J]. *Inflammation*, 2016, 39(5): 1757
- [10] 胡洋,朱捷,张迪,等.海水浸泡对兔脊髓损伤后TNF- $\alpha$ 及VEGF表达的影响[J]. *安徽医学*, 2015, 36(11): 1313
- [11] Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome[J]. *J Pathol*, 2004, 202(2): 145
- [12] Aiming L, Naoki T, Lu S, et al. Saikosaponin d protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibiting NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 223: 80
- [13] 张列亮,应俊,华福洲,等.柴胡皂苷A通过cAMP/CREB信号通路对脑损伤大鼠认知功能的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(5): 484
- [14] Oyinbo C A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade[J]. *Acta Neurobiol Exp*, 2011, 71(2): 281
- [15] Yongsun K, Sung-ho J, Wan H K, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 229
- [16] Weiss S J. Tissue destruction by neutrophils[J]. *N Engl J Med*, 1989, 320(6): 365
- [17] Guangwen R, Xin Z, Li Y Z, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression[J]. *J Immunol*, 2010, 184(5): 2321
- [18] 王保华.白藜芦醇对大鼠脊髓缺血再灌注损伤组织中TNF- $\alpha$ 和IL-6水平的影响[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2016, 19(12): 100

(2016-10-22 收稿)